N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A o 2490

ARTICLE PRINCIPAL
Recouvrant en tout

LA THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES
de PARIS

par

Madame Renée TOURY

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : ISOLEMENT ET PURIFICATION DES MEMBRANES MITOCHONDRIALES. ETUDE ENZYMATIQUE DE LA MEMBRANE EXTERNE.

soutenue le 8-4-1968 devant la Commission d'Examen

MM. M. PASCAUD Président
H. CLAUSER Examinateurs
J. ANDRE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Reprinted from
Biochimica et Biophysica Acta
Elsevier Publishing Company
Amsterdam
Printed in The Netherlands

BBA 75070

SÉPARATION DES MEMBRANES MITOCHONDRIALES. PURIFICATION ET CARACTÉRISATION ENZYMATIQUE DE LA MEMBRANE EXTERNE

MARIANNE LÉVY*, RENÉE TOURY* ET JEAN ANDRÉ**

*Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, Faculté des Sciences, Paris** et Biologie Cellulaire 4, Faculté des Sciences, Orsay** (France)*

(Reçu le 10 mars, 1967)

SUMMARY

Separation of the mitochondrial membranes. Purification and enzymatic characterization of the outer membrane

(1) With the aim of studying the enzymatic activities of the outer mitochondrial membrane, a method is described for separating the 2 mitochondrial membranes which is based on the successive actions of digitonin and sonication. The crude fraction of the outer membrane was subsequently purified by centrifugation in a continuous density gradient.

(2) The 2 membranes differ in their ultrastructural aspect, their density and their enzymatic activities. The outer membrane, which lacks the enzymes of the oxidative phosphorylation, possesses a non-phosphorylating NADH:cytochrome *c* reductase (NADH:ferricytochrome *c* oxidoreductase, EC 1.6.99.3) activity that is insensitive to the inhibitory actions of rotenone and antimycin.

INTRODUCTION

On sait que l'enveloppe des mitochondries est composée de 2 membranes dont l'*externe* est arrondie de façon régulière et l'*interne* plissée en crêtes. Il est généralement admis que c'est sur la membrane interne que sont localisés les enzymes de la chaîne respiratoire phosphorylante sensibles aux actions inhibitrices de la roténone, de l'antimycine et du cyanure[1–6]. Il nous a paru intéressant de chercher à mettre en évidence d'éventuelles activités enzymatiques sur la membrane externe. Il fallait pour cela, dans un premier temps, séparer les 2 membranes l'une de l'autre. Nous y sommes parvenus par l'action successive de la digitonine et des ultra-sons sur des mitochondries isolées. Les fractions brutes de membrane externe et de membrane interne ont été purifiées puis caractérisées du point de vue enzymatique. Nos recherches ont abouti à la mise en évidence sur la membrane externe, d'une NADH: cytochrome *c* réductase (NADH:ferricytochrome *c* oxydoréductase, EC 1.6.99.3) insensible aux actions inhibitrices de la roténone et de l'antimycine. Une partie de ce travail a déjà été publiée sous forme de notes préliminaires[7,8]. Le présent mémoire en constitue le développement.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Préparation des mitochondries

Les mitochondries sont isolées à partir de foies de rats Wistar de 180–200 g. Les foies sont homogénéisés dans 9 fois leur volume de saccharose à 0.25 M. Les noyaux et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 600 × *g* (2000 tours/min à la centrifugeuse Jouan refroidie) pendant 10 min. Le surnageant est centrifugé pendant 10 min à 8500 × *g* (10 000 tours/min, rotor No. 30, à la centrifugeuse Spinco L). Le culot obtenu est formé de 2 couches: une couche compacte, composée de mitochondries "lourdes", et une couche floconneuse, composée de mitochondries "légères" et d'ergastoplasme. Cette dernière couche est éliminée par lavage. Les mitochondries ainsi obtenues sont remises en suspension dans un volume de saccharose à 0.25 M égal au tiers du volume de l'homogénat initial, puis elles sont centrifugées à 8500 × *g*, et, comme précédemment, on élimine la couche floconneuse. L'opération est répétée 2 fois. Cette technique, mise au point par HAREL, JACOB ET MOULÉ[9], permet d'obtenir des mitochondries à peu près dépourvues de contamination ergastoplasmique, ce que nous avons vérifié par l'absence d'activité glucose-6-phosphatasique (D-glucose-6-phosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.9).

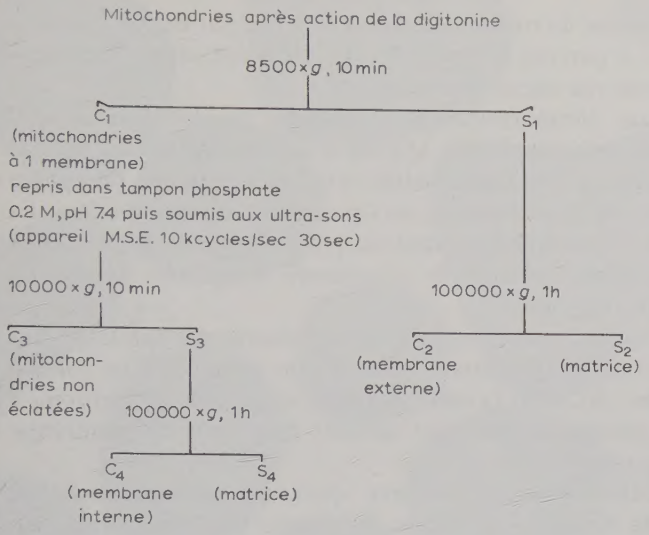
Préparation des fragments de membranes

Les mitochondries sont reprises dans un très faible volume de saccharose à 0.25 M et additionnées d'une solution de digitonine à 2% (bibl. 10) de manière à ce que la concentration finale de digitonine soit de 0.80%, ce qui correspond à environ 1 mg de digitonine par mg de protéine. Le mélange est maintenu à 0° pendant une demi-heure. On ajoute alors du saccharose à 0.25 M de façon à amener la concentration de digitonine à 0.25% et on centrifuge pendant 10 min à 8500 × *g*. Le culot est composé de 2 couches: l'une compacte, et l'autre floconneuse. Comme il sera dit ultérieurement, ces 2 couches sont constituées de mitochondries ne possédant plus qu'une seule membrane mais qui diffèrent par la densité de leur matrice. Le surnageant, qui contient les fragments de membrane externe et de la matrice ayant diffusé, est centrifugé pendant 1 h à 100 000 × *g* (40 000 tours/min, rotor No. 40, Spinco L). On obtient le culot que nous nommons C_2; il est constitué principalement de membrane externe, tandis que la matrice reste en suspension dans le surnageant S_2.

Les mitochondries à une membrane sont mises en suspension dans du tampon phosphate 0.2 M de pH 7.4 et soumises pendant 30 sec à l'action des ultra-sons (appareil M.S.E., 10 KC). Les mitochondries non éclatées sont éliminées par centrifugation à 10 000 × *g* (12 500 tours/min, rotor No. 40, Spinco L) pendant 10 min. Le surnageant, qui contient les fragments de membrane interne et de la matrice, est centrifugé pendant 1 h à 100 000 × *g*. On obtient alors le culot que nous nommons C_4; il contient les fragments de membrane interne, tandis que la matrice reste dans le surnageant S_4. L'ensemble de ces opérations est représenté par le schéma.

Purification des fragments de membrane externe

Le culot C_2 est déposé sur un gradient continu de 25 à 50% de saccharose, puis centrifugé pendant 10 h à 25 000 tours/min (rotor SW25, Spinco L).



Schéma

Microscopie électronique

Les mitochondries de départ et les différents culots C_1, C_2, C_3, C_4 sont examinés par la méthode des coupes après fixation au tétroxyde d'osmium dans un tampon phosphate 0.1 M et inclusion à l'épikote selon les procédés courants.

Les surnageants S_2 et S_4 sont examinés par la méthode de coloration négative. Pour cela, une grille porte-objet munie d'une membrane de formvar-carbone est recouverte d'une gouttelette du surnageant à examiner, partiellement séchée au papier-filtre, recouverte d'une gouttelette d'acide phosphotungstique à 1%, et enfin séchée complètement par évaporation.

Déterminations chimiques et enzymatiques

Les protéines sont déterminées par la méthode du biuret[11] ou par la méthode LOWRY *et al.*[12].

Le phosphore est déterminé par la méthode de BERENBLUM ET CHAIN[13] après défécation trichloracétique et extraction du phosphore libre sous forme de phosphomolybdate dans l'isobutanol.

Les activités de la NADH-oxydase, de la succinate-oxydase, de la β-hydroxybutyrate-oxydase (NADH:oxygène oxydoréductase, succinate:oxygène oxydoréductase, D-3-hydroxybutyrate:oxygène oxydoréductase, EC classe I) sont mesurées par la consommation d'oxygène à l'appareil de Warburg à 30°. Les milieux sont constitués comme suit: tampon Tris (pH 7.4): 66 mM; substrat: 11.6 mM; $MgCl_2$: 3.3 mM; tampon phosphate (pH 7.4): 20 mM; ADP: 2.6 mM; glucose: 16.6 mM; hexokinase (ATP:D-hexose 6-phosphotransférase, EC 2.7.1.1): 150 unités Koenitz MacDonald; fragments de membrane (C_2 ou C_4): 2–3 mg de protéines. Le volume total est de 3 ml. Dans le cas de la β-hydroxybutyrate-oxydase on ajoute 0.7 μmole de NAD par fiole. Pour l'étude de l'influence du cytochrome *c* on ajoute du cytochrome *c* oxydé de façon à ce que sa concentration dans le milieu soit 0.022 mM. L'action des inhibiteurs est mesurée après incubation de la préparation à 0° pendant

10 min en présence, suivant le cas, de roténone à raison de 20 μg par mg de protéines ou d'antimycine à raison de 1 par mg de protéines. Le KCN est ajouté extemporanément à raison de 0.4 μmole par mg de protéines.

La cytochrome-oxydase (ferrocytochrome *c*:oxygène oxydoréductase, EC 1.9.3.1) est mesurée par spectrophotométrie à 550 mμ à la température du laboratoire dans un milieu contenant: cytochrome *c* réduit: 0.056 mM; tampon phosphate (pH 7.4): 34.3 mM; fragments de membrane (C_2 ou C_4): 0.2–0.3 mg de protéines. Le volume total est de 3.5 ml. Le cytochrome *c* réduit est préparé selon la technique de CHANTRENNE[14], par passage d'une solution de cytochrome *c* sur une colonne de résine Duolite S_{10} préalablement réduite.

L'activité de la NADH:cytochrome *c* réductase est mesurée par spectrophotométrie à 550 mμ, par l'apparition du cytochrome *c* réduit dans un milieu d'un volume total de 3.5 ml, composé de: KCN: 0.14 mM; NADH: 0.042 mM; cytochrome *c* oxydé: 0.037 mM; tampon phosphate (pH 7.4): 20 mM; fragments de membrane (C_2 ou C_4): 0.3 ou 1 mg de protéines.

L'activité de la NADH-oxydase est mesurée spectrophotométriquement à 340 mμ, par la disparition du NADH d'un milieu de volume total de 3.5 ml composé de: NADH: 0.042 mM; tampon phosphate (pH 7.4): 20 mM; C_2 ou C_4: 0.3 – 0.5 mg de protéines.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

(I) Séparation des fragments de l'une et l'autre membranes

(a) Caractérisation morphologique des fractions

La Fig. 1 montre les mitochondries de départ. La plupart sont bien conservées. Quelques unes seulement ont subi des dommages qui résultent sans doute en majeure partie de l'homogénéisation. La contamination ergastoplasmique est faible.

La Fig. 2 montre le culot C_1. La digitonine a profondément modifié les mitochondries: elles ne possèdent plus qu'une membrane. Elles sont dilatées et leur matrice est claire et granuleuse. Les crêtes, devenues rares, ont pris la forme de tubes sinueux de diamètre irrégulier.

La Fig. 3 montre une mitochondrie en cours de transformation sous l'action de la digitonine. On voit la membrane externe se détacher de la membrane interne et se replier sur elle-même en formant une vésicule. La partie de la mitochondrie qui se trouve dépouillée de sa membrane externe a perdu ses crêtes, tandis que l'autre partie, qui conserve encore ses 2 membranes, possède des crêtes; mais celles-ci toutefois ont déjà changé d'aspect. Dans les conditions où nous l'avons employée, la digitonine possède donc la propriété de fragmenter la membrane externe et de la détacher du reste de la mitochondrie tout en respectant la membrane interne. Cette innocuité de la digitonine envers la membrane interne est confirmée par le fait que les mitochondries à une seule membrane résistent à une seconde action de la digitonine. On peut dès lors s'attendre à ce que le surnageant S_1 contienne essentiellement des fragments de membrane externe. En effet, le culot C_2 est composé de vésicules de tailles diverses (Fig. 4). En toute vraisemblance, ces vésicules sont les fragments découpés par la digitonine dans la membrane externe qui se sont remodelés spontanément en sphères.

Le culot C_4 est constitué d'un empilement de membranes tassées les unes sur

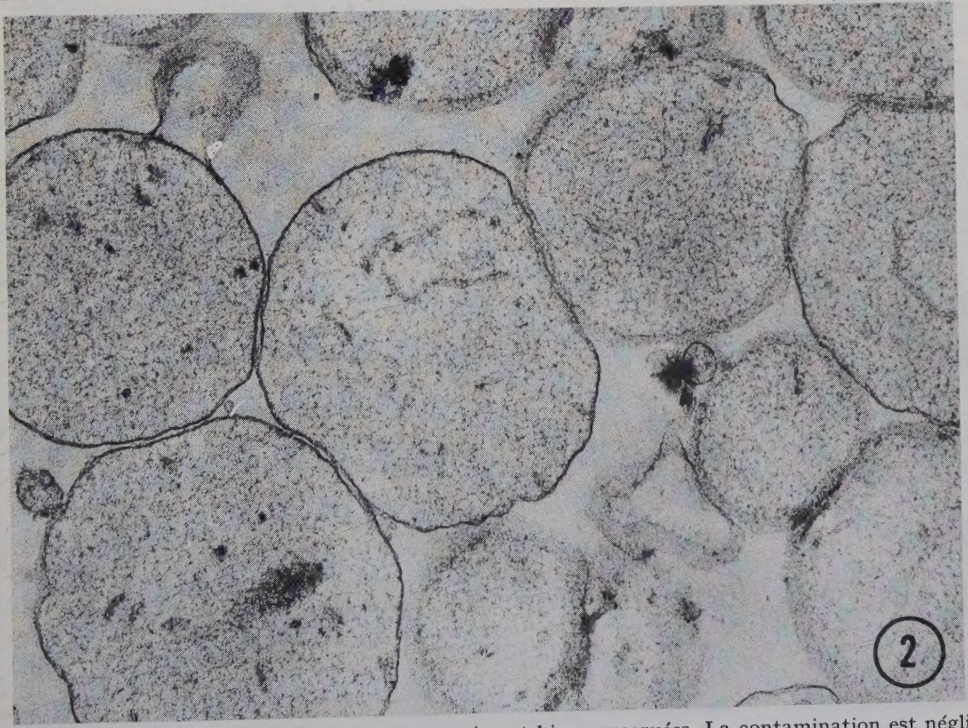
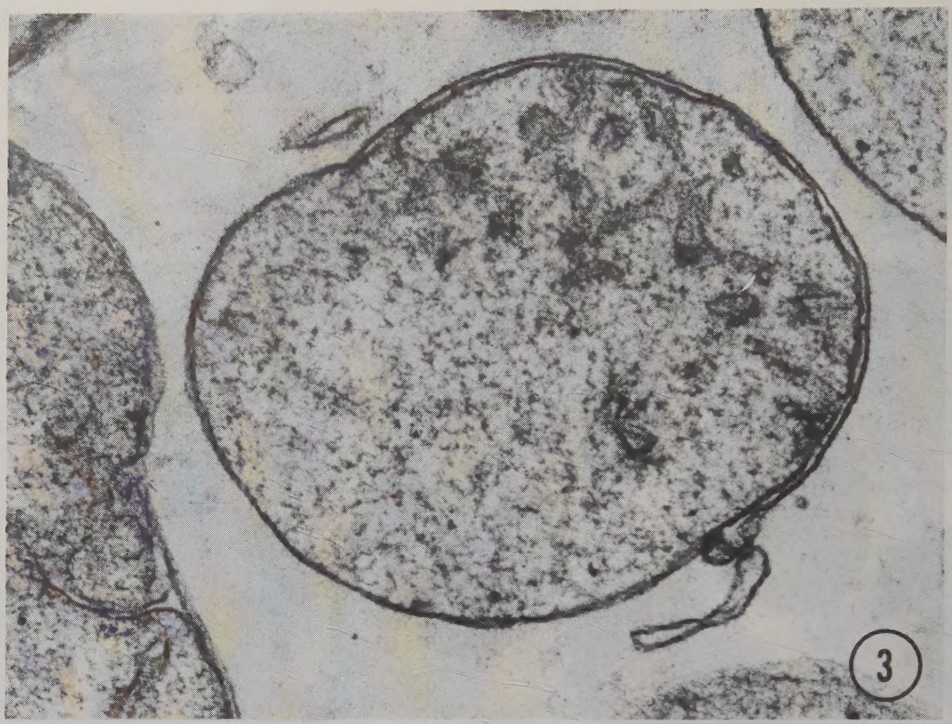


Fig. 1. Mitochondries de départ. Elles apparaissent bien conservées. La contamination est négligeable. × 30 000.

Fig. 2. Culot C_1: action de la digitonine. Les mitochondries sont dilatées; leur enveloppe ne comprend plus qu'une seule membrane; les crêtes sont rares, transformées en tubes sinueux; la matrice est claire et granuleuse. × 30 000.



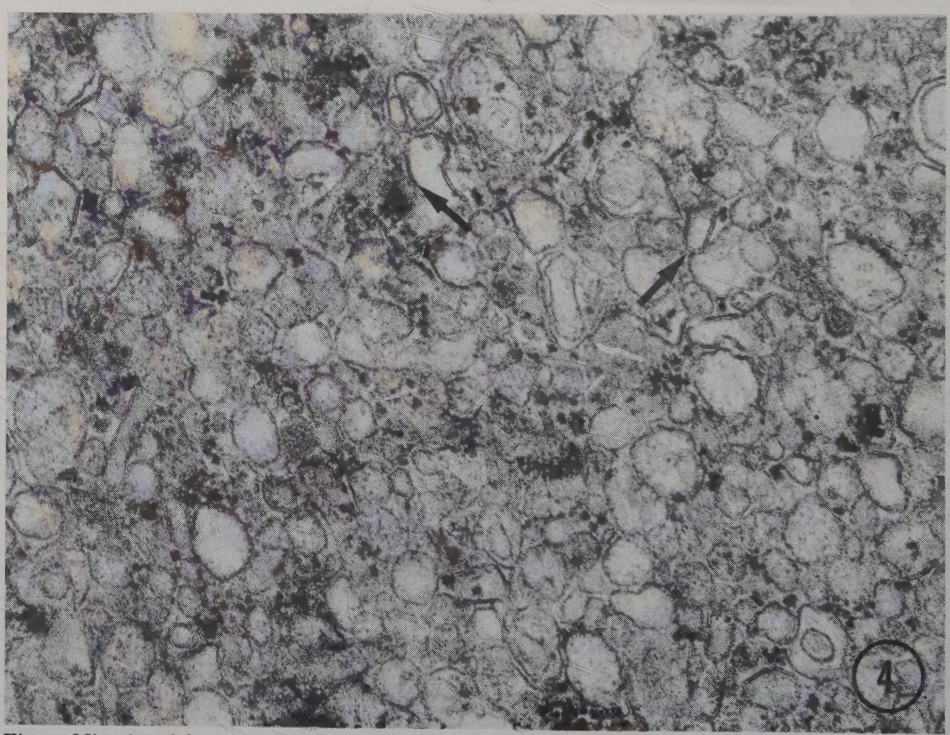
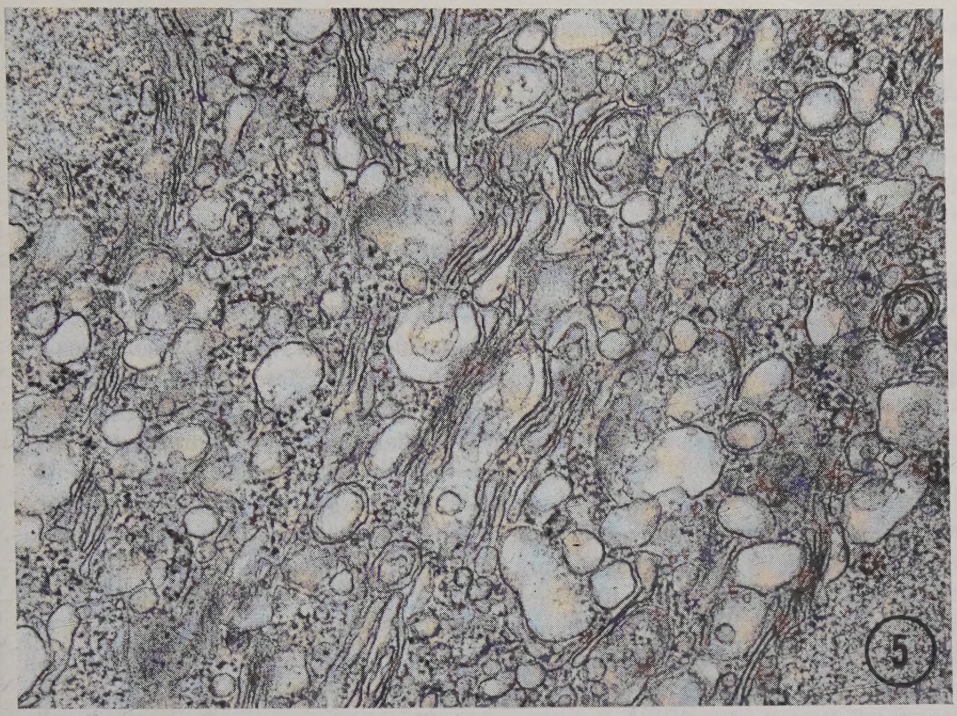


Fig. 3. Mitochondrie en cours de transformation sous l'action de la digitonine. On voit la membrane externe détachée de la membrane interne et repliée sur elle-même en vésicule. Dans sa moitié dénudée, la mitochondrie n'a plus de crêtes: il est probable que les crêtes se sont déplissées et incorporées à la membrane interne, dont la surface s'est accrue. × 60 000.

Fig. 4. Culot C_2. Vésicules arrondies qui sont vraisemblablement le résultat de l'enroulement des fragments découpés par la digitonine dans la membrane externe. Ce culot contient un peu de contamination (grains de glycogène et ribosomes). Flèches: bâtonnets doubles, qui représentent probablement le complexe digitonine–cholestérol. × 60 000.



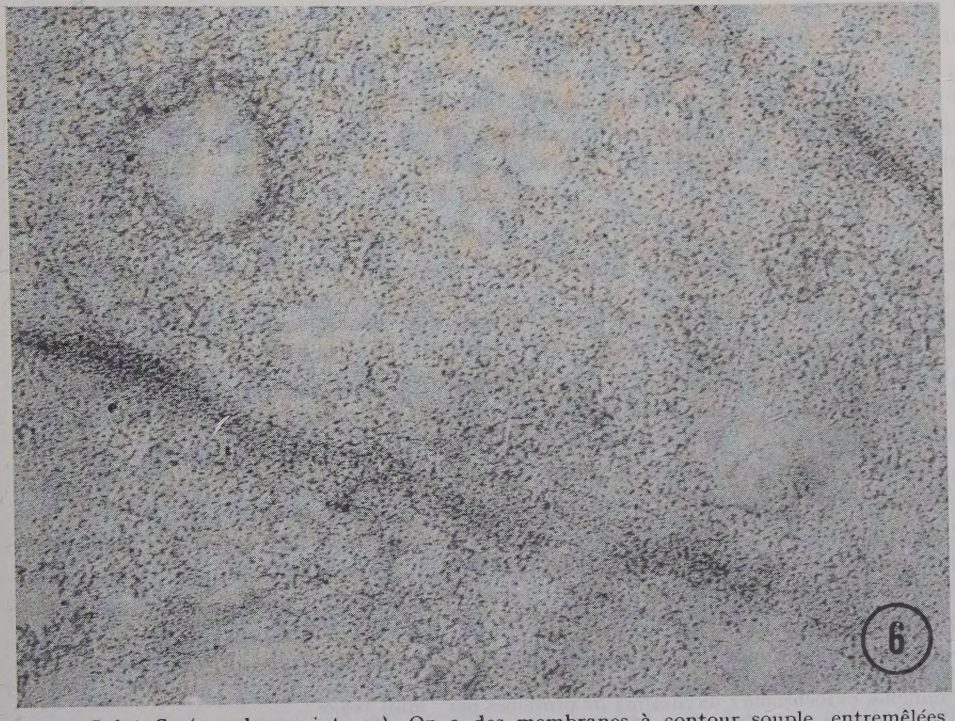


Fig. 5. Culot C_4 (membrane interne). On a des membranes à contour souple, entremêlées de vésicules de tailles variées. Ce culot contient un peu de contamination. × 30 000.

Fig. 6. Surnageant S_4 (matrice). Aucune structure membranaire. × 90 000.

les autres et entremêlées de vésicules (Fig. 5). De toute évidence, il est formé des membranes, rompues par les ultra-sons, des mitochondries du culot C_1, c'est à dire des membranes internes des mitochondries initiales. Les surnageants S_2 et S_4 ne présentent plus aucune structure organisée aisément reconnaissable, en tous cas aucune structure membranaire (Fig. 6). Ils contiennent essentiellement la matrice libérée des mitochondries initiales.

(b) Caractérisation biochimique et enzymatique des fragments de membrane avant purification

Le dosage des protéines montre que les mitochondries à une seule membrane du culot C_1 contiennent environ 85% des protéines totales des mitochondries de départ. Les culots C_2 (membrane externe) et C_4 (membrane interne) en représentent respectivement environ 3% et 16%. Ces chiffres diffèrent entre eux dans le même sens que les surfaces respectives des 2 membranes dans les mitochondries intactes.

Activités oxydasiques. Tenant compte des données généralement admises selon lesquelles les enzymes de la chaîne respiratoire phosphorylante sont localisés sur la membrane interne[1-6], nous avons mesuré l'activité de ces enzymes dans le culot C_4. Des mesures parallèles ont été effectuées sur le culot C_2, pour en vérifier le degré de pureté. D'autre part, guidés par l'opinion émise d'abord par LEHNINGER[15], puis reprise par ERNSTER[16], selon laquelle les mitochondries catalysent 2 types d'oxydation du NADH, dont l'une, "externe", nécessite l'adjonction de cytochrome *c* et a lieu à la "surface" des mitochondries, nous avons émis l'hypothèse que ce type d'oxydation serait localisé sur la membrane externe; à cet effet nous avons effectué sur le culot C_2 des mesures de l'oxydation du NADH en présence de cytochrome *c*. La spécificité de l'action du cytochrome *c* sur l'oxydation du NADH par la membrane externe, a été vérifiée par le fait que l'adjonction du cytochrome *c* est sans effet, d'une part, sur l'oxydation du NADH par les fragments de membrane interne (culot C_4) et,

TABLEAU I

MESURE DES ACTIVITÉS OXYDASIQUES DU CULOT C_2 (MEMBRANE EXTERNE AVANT PURIFICATION)

Composition des mélanges: (1) pour la mesure de la succinate-oxydase, de la β-hydroxybutyrate-oxydase, de la NADH-oxydase: tampon Tris (pH 7.4): 66 mM; substrat: 11.6 mM; $MgCl_2$: 3.3 mM; tampon phosphate (pH 7.4): 20 mM; ADP: 2. 6 mM; glucose: 16.6 mM; hexokinase: 150 unités Koenitz MacDonald; 2–3 mg de protéines; volume total: 3 ml. Température: 30°. (2) pour la mesure de la NADH-oxydase en présence de cytochrome *c* on ajoute: cytochrome *c*: 0.022 mM. (3) pour la mesure de la cytochrome-oxydase: cytochrome *c* réduit: 0.056 mM; tampon phosphate (pH 7.4): 34.3 mM; 0.2–0.3 mg de protéines.

Enzyme étudié	*Activité mesurée*
Succinate-oxydase (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	31.7
β-Hydroxybutyrate-oxydase (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	33.5
NADH-oxydase (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	52.8
Cytochrome-oxydase (mμmoles cytochrome *c* oxydés/mg de protéines par min)	219.0
NADH-oxydase (en présence de cytochrome *c*) (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	117.0

d'autre part, sur l'oxydation des autres substrats (succinate et β-hydroxybutyrate) par les fragments de membranes interne et externe (culots C_2 et C_4). Les résultats de activités oxydasiques des fragments de membranes non purifiés sont groupés dans les Tableaux I et II. Des mesures de la cytochrome oxydase ont, en outre, été effectuées dans les surnageants S_2 et S_4.

Nos résultats montrent que: (1) les surnageants n'ont pas d'activité oxydasique (S_2: 0.0 mμmole cytochrome *c* oxydé par mg de protéines par min) ou seulement une très faible activité (S_4: 117.0 mμmoles cytochrome *c* oxydé/mg de protéines par min) lorsque l'on prend comme test la cytochrome-oxydase, ce qui permet de conclure, en complet accord avec l'examen au microscope électronique, qu'ils sont exempts de fragments de membranes; (2) le culot C_4 *(membrane interne)* possède une forte activité des enzymes de la chaîne respiratoire, que le substrat oxydé soit le NADH, le succinate, le β-hydroxybutyrate ou le cytochrome *c* (Tableau II); les valeurs du rapport P/O sont respectivement égales à 1.44 pour l'oxydation du succinate, à 1.40 pour l'oxydation du β-hydroxybutyrate et à 0.86 pour l'oxydation du NADH; (3) le culot C_2 *(membrane externe non purifiée)* présente une activité respiratoire faible si on la compare à celle du culot C_4 (Tableaux I et II). Lorsque le

TABLEAU II

MESURE DES ACTIVITÉS OXYDASIQUES DU CULOT C_4 (MEMBRANE INTERNE)

Composition des mélanges: voir Tableau I.

Enzyme étudié	*Activité mesurée*
Succinate-oxydase (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	121.1
β-Hydroxybutyrate-oxydase (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	106.0
NADH-oxydase (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	150.8
Cytochrome-oxydase (mμmoles cytochrome *c* oxydés/mg de protéines par min)	1161.0

substrat est le NADH, le cytochrome *c* augmente considérablement la consommation d'oxygène (Tableau I). Les valeurs du rapport P/O sont de 1.28 pour l'oxydation du succinate, 1.86 pour celle du β-hydroxybutyrate; pour l'oxydation du NADH, ce rapport s'abaisse de 0.95, en absence de cytochrome *c*, à 0.43, en présence de cytochrome *c*; ce dernier résultat montre que l'augmentation de la consommation d'oxygène observée ne s'accompagne pas d'une augmentation de la phosphorylation.

Cet ensemble de données met en évidence, dans le culot C_2, 2 types d'oxydations vraisemblablement attribuables à 2 fractions distinctes de ce culot: (a) une activité oxydasique élevée lorsque le NADH est oxydé en présence de cytochrome *c*, activité qui ne se manifeste pas dans le culot C_4; (b) des activités oxydasiques beaucoup plus faibles, identiques à celles du culot C_4, qui laissent supposer une contamination du culot C_2 par des fragments de membrane interne.

Action des inhibiteurs. Nous avons aussi vérifié que dans les culots C_2 et C_4 l'oxydation du succinate est inhibée par l'antimycine et le KCN, celles du β-hydroxy-

TABLEAU III

ACTION COMPARÉE DES INHIBITEURS SUR L'OXYDATION DU NADH EN PRÉSENCE ET EN ABSENCE DE CYTOCHROME *c* PAR LES FRAGMENTS DE MEMBRANE EXTERNE AVANT PURIFICATION (CULOT C_2)

Composition des mélanges: système complet (voir Tableau I) auquel on ajoute antimycine (1 μg/mg de protéines) ou roténone (20 μg/mg de protéines) ou KCN (0.4 μmole/mg de protéines).

Enzyme étudié	*Inhibiteur ajouté*	*Activité mesurée*	*Pourcentage d'inhibition*
NADH-oxydase (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	–	28.5	
	Antimycine	5.4	80.9
	Roténone	1.9	92.6
	KCN	0.8	96.8
NADH-oxydase (en présence de cytochrome *c*) (mμatomes O consommés/mg de protéines par min	–	96.5	
	Antimycine	31.3	16.1
	Roténone	92.3	7.2
	KCN	4.8	95.9

butyrate et du NADH sont inhibées par la roténone, l'antimycine et le KCN. Ces inhibitions sont identiques à celles observées par de nombreux auteurs sur des mitochondries entières ou des préparations globales de membranes mitochondriales. Par contre, en présence de cytochrome *c*, l'oxydation du NADH par le culot C_2 n'est inhibée que par le KCN (Tableau III). Cette oxydation se fait donc par une voie enzymatique insensible à l'action de la roténone et de l'antimycine.

TABLEAU IV

MESURE DES ACTIVITÉS OXYDASIQUES DE LA BANDE SUPÉRIEURE (MEMBRANE EXTERNE PURIFIÉE)

Composition des mélanges: (1) pour la mesure de la succinate-oxydase, de la β-hydroxybutyrate-oxydase, de la NADH-oxydase, de la cytochrome-oxydase, de la NADH-oxydase en présence de cytochrome *c*, voir Tableau I. (2) Pour la mesure de la NADH:cytochrome *c* réductase: NADH: 0.042 mM; cytochrome *c* oxydé: 0.037 mM; tampon phosphate (pH 7.4): 20 mM; KCN: 0.14 mM; 0.3 mg de protéines.

Enzyme étudié	*Activité mesurée*
Succinate-oxydase (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	0.0
β-Hydroxybutyrate-oxydase (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	0.9
NADH-oxydase (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	0.8
Cytochrome-oxydase (mμmoles cytochrome *c* oxydés/mg de protéines par min)	41.3
NADH:cytochrome *c* réductase (mμmoles cytochrome *c* réduits/mg de protéines par min)	461.1
NADH-oxydase (en présence de cytochrome *c*) (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	107.3

Cet ensemble de résultats permet de conclure que le culot C_2 possède, en présence de cytochrome *c*, une forte activité NADH-oxydasique, non phosphorylante, insensible à l'action des inhibiteurs de la chaîne respiratoire phosphorylante. Cette activité spécifique du culot C_2 est donc, en accord avec notre hypothèse de départ,

TABLEAU V

MESURE DES ACTIVITÉS OXYDASIQUES DE LA BANDE INFÉRIEURE (CONTAMINATION)

Composition des mélanges: voir Tableau I.

Enzyme étudié	*Activité mesurée*
Succinate-oxydase (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	38.5
β-Hydroxybutyrate-oxydase (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	34.1
NADH-oxydase (mμatomes O consommés/mg de protéines par min)	37.6
Cytochrome-oxydase (mμmoles cytochrome *c* oxydés/mg de protéines par min)	347.0

attribuable aux fragments de membrane externe qu'il contient. Par contre, les autres activités oxydasiques mesurées dans ce même culot sont dues à une contamination de ce dernier par des fragments de membrane interne. Pour obtenir une fraction plus pure de membrane externe, nous avons soumis le culot C_2 à un fractionnement par centrifugation en gradient de densité.

(II) Purification de la membrane externe.

Soumis à une centrifugation en gradient de saccharose de densité continue, le culot C_2 se sépare en 2 bandes distinctes: une bande supérieure, translucide, brun-rougeâtre, de densité 1.10–1.12, et une bande inférieure, trouble, brun clair, de densité 1.16–1.18.

(a) Caractérisation morphologique des fractions

L'étude au microscope électronique des 2 bandes, montre qu'elles sont très différentes l'une de l'autre.

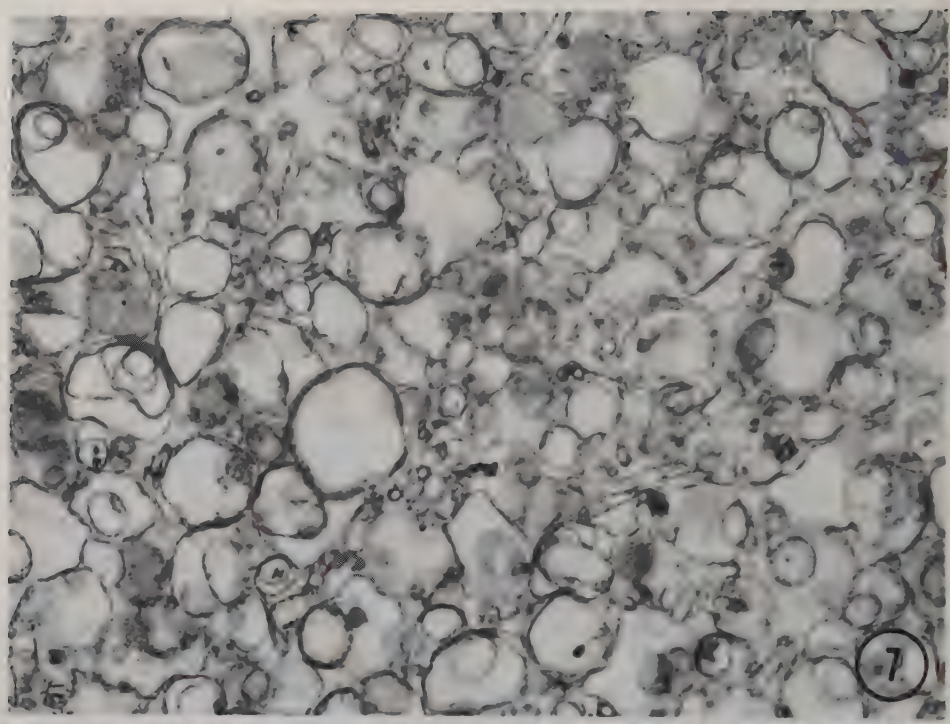
La bande supérieure, remarquablement homogène (Fig. 7), est composée à peu près exclusivement de vésicules arrondies à contenu clair, occasionnellement emboîtées, d'un diamètre moyen de l'ordre de un tiers de μ. Ce sont de telles vésicules qui composaient l'essentiel du culot C_2. Cette fraction renferme donc à peu près exclusivement des fragments de membrane externe.

La bande inférieure, hétérogène (Fig. 8), ne comporte aucune de ces vésicules. On y trouve 3 éléments distincts: des membranes ondulées qui sont vraisemblablement des fragments de membrane interne qui contaminaient le culot de départ (C_2), des ribosomes groupés en amas irrégulièrement répartis, et de courts bâtonnets composés de 2 lignes droites parallèles, très opaques, qui ressemblent à ceux du complexe formé, *in vitro*, par le cholestérol et la digitonine (Fig. 9).

(b) Caractérisation enzymatique des fractions

Les différentes activités enzymatiques mesurées sur la bande supérieure (membrane externe purifiée) et sur la bande inférieure (contamination), sont groupées dans les Tableaux IV et V. On constate que:

(1) La bande supérieure (membrane externe purifiée), mise à part une faible activité cytochrome-oxydasique, ne présente aucune activité de la chaîne respiratoire



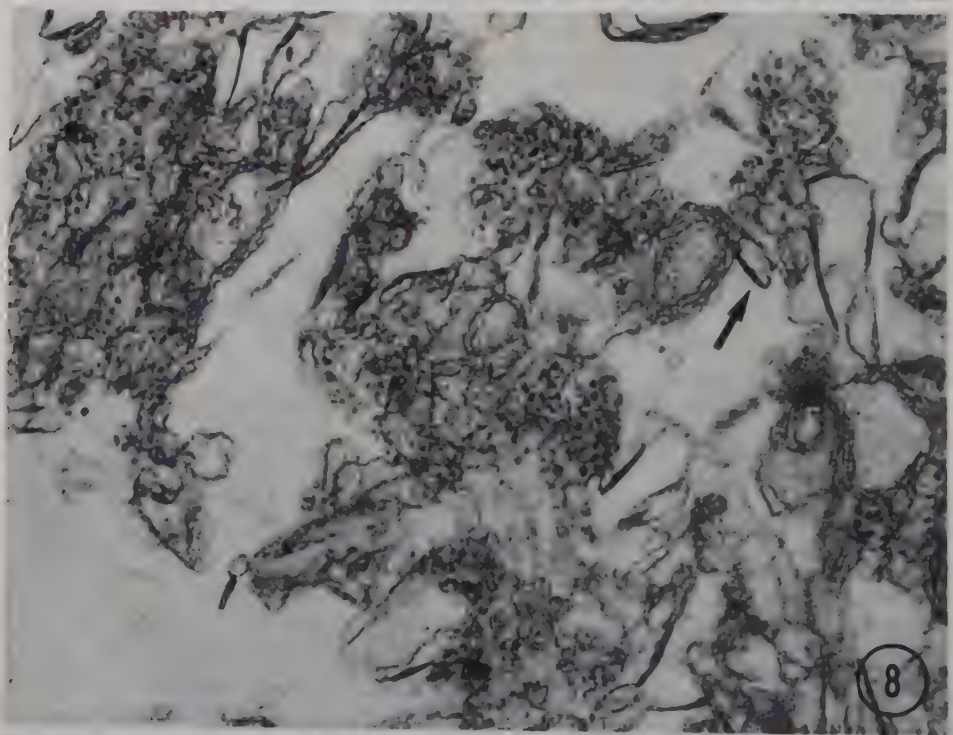


Fig. 7. Purification du culot C_2 : bande supérieure. Cette bande est composée presque exclusivement de vésicules arrondies (fragments de membrane externe). × 30 000.

Fig. 8. Purification du culot C_2 : bande inférieure. Cette bande comprend des membranes ondulées (fragments de membrane interne), des ribosomes et des bâtonnets du complexe digitonine-cholestérol (flèche). × 60 000.

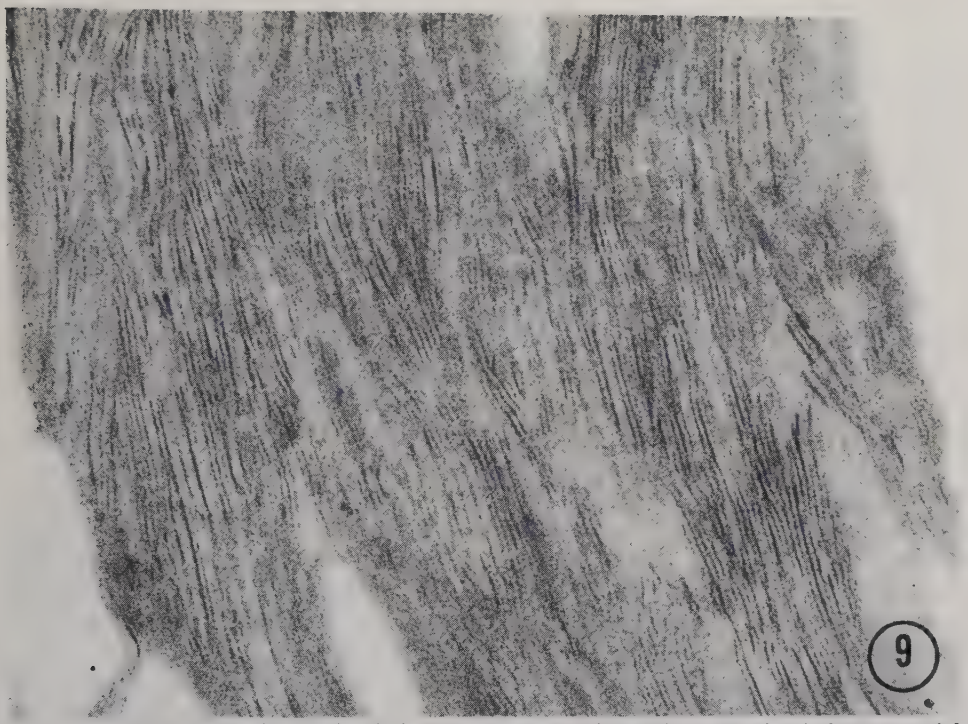


Fig. 9. Complexe digitonine–cholestérol obtenu *in vitro* à partir de cholestérol commercial. × 160 000.

(Tableau IV). En accord avec l'hypothèse émise précédemment, elle possède une forte activité NADH:cytochrome *c* réductasique, insensible à l'inhibition par la roténone et par l'antimycine. Cette voie enzymatique n'est pas phosphorylante. Le cytochrome *c* réduit ainsi formé, peut subir néanmoins une oxydation ultérieure, due à la cytochrome-oxydase encore présente, comme le montrent les mesures d'une NADH-oxydase en présence de cytochrome *c*. Cette activité est évidemment insensible à l'inhibition par la roténone et par l'antimycine. L'ensemble de ces résultats tend à prouver que la bande supérieure est bien une fraction de membrane externe de haute pureté.

(2) La bande inférieure (contamination), au contraire, présente une forte activité des enzymes de la chaîne respiratoire pour les 4 substrats employés (Tableau V), activité sensible aux actions inhibitrices de la roténone et de l'antimycine. La bande inférieure renferme donc les fragments de membrane interne qui contaminaient le culot C_2. Ce sont eux qui se présentent au microscope électronique sous la forme de membranes ondulées.

DISCUSSION ET CONCLUSION

De l'ensemble des résultats présentés, il ressort, ainsi que nous l'avons déjà publié[7,8], que, dans les conditions où nous l'avons employée, la digitonine détache électivement la membrane externe des mitochondries. Ce résultat vient d'être récemment confirmé par SCHNAITMAN, ERWIN ET GREENAWALT[17]. La spécificité d'ac-

tion de la digitonine sur la membrane externe des mitochondries est d'un grand intérêt, puisque l'on sait que la digitonine se combine avec le cholestérol. Il est donc permis de supposer que le cholestérol est principalement localisé dans la membrane externe, ou tout au moins qu'il est plus accessible à l'action de la digitonine sur cette membrane que sur la membrane interne. En accord avec cette manière de voir, le culot C_2, examiné au microscope électronique (Fig. 4 et Fig. 8), présente de courts bâtonnets, qui ressemblent à ceux du complexe formé, *in vitro*, par le cholestérol et la digitonine (Fig. 9).

Les fragments de membrane externe détachés par la digitonine se réorganisent en vésicules à contour régulièrement arrondi, d'aspect rigide, alors que ceux de la membrane interne rompue par l'action des ultra-sons ont un aspect ondulé à contour plus souple. La purification de ces membranes par gradients de densité a permis de constater que la membrane externe est plus légère (densité 1.10–1.12) que la membrane interne (densité 1.15–1.16). Cette différence de densité s'explique par la teneur en phospholipides beaucoup plus élevée dans la membrane externe que dans la membrane interne[18,19].

Enfin les membranes externe et interne des mitochondries diffèrent considérablement par leurs activités enzymatiques. La membrane externe, dépourvue des activités de la chaîne respiratoire phosphorylante caractéristiques de la membrane interne, possède, en propre, une forte activité NADH:cytochrome *c* réductasique, non phosphorylante et insensible aux actions inhibitrices de la roténone et de l'antimycine. Le cytochrome *c* ainsi réduit peut toutefois subir une oxydation ultérieure due à la présence énigmatique d'une faible activité cytochrome-oxydasique; celle-ci peut-être attribuée, soit à la membrane interne dont elle aurait été détachée, soit à la membrane externe elle-même.

La localisation sur la membrane externe d'une NADH:cytochrome *c* réductase est en plein accord avec les travaux très récents de PARSONS et coll.[19] et de SOTTOCASA et coll.[20] qui utilisent, pour la séparation des membranes mitochondriales, une technique différente de la nôtre, préconisée par PARSONS, WILLIAMS ET CHANCE[21]. Recherchant les cytochromes contenus dans la membrane externe, PARSONS et coll.[19] et SOTTOCASA et coll.[20] mettent en évidence la présence d'un cytochrome b_5 qui intervient dans l'activité cytochrome *c* réductasique. Cet ensemble de résultats les amènent à faire un rapprochement entre la membrane externe des mitochondries et la membrane ergastoplasmique qui possède cette même chaîne enzymatique[22]. Toutefois, le rapprochement ne saurait être total, puisque la membrane ergastoplasmique possède en propre une activité NADPH:cytochrome *c* réductasique (NADPH: ferricytochrome *c* oxydoréductase, EC 1.6.99.3), et une activité glucose-6-phosphatasique[23,24] absentes sur la membrane externe[19,20].

D'autres activités enzymatiques localisées sur la membrane externe ont été récemment signalées. Une activité des enzymes du cycle tricarboxylique et de ceux de l'oxydation et de la synthèse des acides gras a été avancée par ALLMANN, BACHMANN ET GREEN[25]. Ce résultat semble *a priori* assez surprenant car ces enzymes sont généralement considérés comme faisant partie de la matrice. Par ailleurs SCHNAITMAN et coll.[17] signalent, sur la membrane externe des mitochondries, une activité mono-amine-oxydasique. En toute vraisemblance, il existe encore d'autres enzymes et il est dans notre intention de poursuivre leur recherche.

RÉSUMÉ

(1) Dans le but de rechercher les activités enzymatiques de la membrane externe des mitochondries, nous avons mis au point une méthode de séparation des 2 membranes mitochondriales basée sur l'action successive de la digitonine et des ultra-sons. La fraction brute de membrane externe a été ensuite purifiée par centrifugation en gradients de saccharose de densité continue.

(2) Les 2 membranes diffèrent par leur aspect ultrastructural, leur densité et leurs activités enzymatiques. La membrane externe, qui est dépourvue des enzymes de la chaîne respiratoire phosphorylante, possède en propre une activité NADH: cytochrome *c* réductasique, non phosphorylante, et insensible aux actions inhibitrices de la roténone et de l'antimycine.

BIBLIOGRAPHIE

1 G. E. PALADE, in O. H. GAEBBLER, *Enzymes: Units of Biological Structure and Function*, Academic Press, New York, 1956, p. 185.
2 A. L. LEHNINGER, *Pediatrics*, 26 (1960) 446.
3 R. W. ESTABROOK ET A. HOLOWINSKY, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9 (1961) 19.
4 D. E. GREEN, *Comp. Biochem. Physiol.*, 4 (1962) 81.
5 H. FERNANDEZ-MORAN, T. ODA, P. V. BLAIR ET D. E. GREEN, *Science*, 140 (1963) 381.
6 B. CHANCE, D. PARSONS ET G. R. WILLIAMS, *Science*, 143 (1964) 136.
7 M. LEVY, R. TOURY ET J. ANDRE, *Compt. Rend.*, 262 (1966) 1593.
8 M. LEVY, R. TOURY ET J. ANDRE, *Compt. Rend.*, 263 (1966) 1766.
9 L. HAREL, A. JACOB ET Y. MOULÉ, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 39 (1957) 819.
10 T. M. DEVLIN ET A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1586.
11 H. W. ROBINSON ET C. G. HODGEN, *J. Biol. Chem.*, 135 (1940) 707.
12 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
13 J. BERENBLUM ET E. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 295.
14 H. CHANTRENNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 58.
15 A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 345.
16 L. ERNSTER, G. DALLNER ET G. F. AZZONE, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 1124.
17 C. SCHNAITMAN, V. ERWIN ET J. GREENAWALT, *J. Cell Biol.*, 32. (1967) 719.
18 M. LEVY ET M. T. SAUNER, *Soc. Biol.*, en préparation.
19 D. F. PARSONS, G. WILLIAMS, W. THOMPSON, D. WILSON ET B. CHANCE, *Proc. Round Table Discussion Mitochondrial Structure and Compartmentation, Bari, 1966*, Adriatica Editrice, Bari, sous presse.
20 G. SOTTOCASA, B. KUYLENSTIERNA, L. ERNSTER ET A. BERGSTRAND, *J. Cell Biol.*, 32 (1967) 415.
21 D. F. PARSONS, G. WILLIAMS ET B. CHANCE, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 137 (1966) 643.
22 P. STRITTMATTER, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 3250.
23 A. H. PHILLIPS ET R. G. LANGDON, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 2652.
24 H. G. HERS, J. BERTHET, L. BERTHET ET C. DE DUVE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33 (1951) 21.
25 D. ALLMANN, E. BACHMANN ET D. E. GREEN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 115 (1966) 165.